

A2

DEMANDE
DE CERTIFICAT D'ADDITION

(21)

N° 76 05084

Se référant : au brevet d'invention n. 73.27536 du 27 juillet 1973.

(54)

Application à titre d'agents antiviraux de composés d'hétéropolyanions contenant du tungstène combiné à de l'antimoine.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.²). A 61 K 33/24; C 01 B 29/02.

(22)

Date de dépôt 24 février 1976, à 15 h 34 mn.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique
le 10 décembre 1975, n. 639.413 au nom de la demanderesse.*

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 27 du 8-7-1977.

(71)

Déposant : Etablissement public dit : AGENCE NATIONALE DE VALORISATION
DE LA RECHERCHE (A.N.V.A.R.), résidant en France.

(72)

Invention de : Jean-Claude Chermann, Claude Jasmin, Georges Mathé et Marcel Raynaud.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (A.N.V.A.R.).

Certificat(s) d'addition antérieur(s) :

L'invention concerne des perfectionnements et des développements apportés à l'objet du brevet principal.

On rappellera que le brevet principal (FR 73.27.536) est relatif à des hétéropolyanions possédant des propriétés antivirales.

5 En particulier, le brevet principal concerne un composé de tungstène et d'antimoine qui est désigné par la référence HPA 23 et dont la préparation est notamment indiquée dans l'exemple donné à titre illustratif.

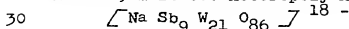
D'une façon générale, pour l'obtention du composé HPA 23 sous
10 la forme de son sel d'ammonium, on fait réagir à chaud une solution aqueuse contenant l'ion Sb^{III} sur une solution 1 M de tungstate de sodium et on maintient le milieu réactionnel sensiblement à neutralité par addition d'hydroxyde d'ammonium concentré en quantité suffisante pour rendre le milieu incolore, ce qui entraîne la précipitation du sel d'ammonium désiré qu'on récupère par filtration et
15 traite ultérieurement de façon usuelle.

La température de la réaction est inférieure à la température d'ébullition du milieu réactionnel, par exemple voisine de 80°C. La solution aqueuse contenant l'ion Sb^{III} est avantageusement préparée
20 en dissolvant SbCl_3 dans une solution saturée de NH_4Cl .

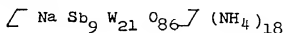
Le brevet principal décrit également les propriétés antivirales du produit HPA 23, qui possède notamment une activité in vivo sur les virus de la leucémie et des sarcomes.

Sous un premier aspect, la présente addition a pour but de préciser la structure du produit HPA 23 dont le mode d'obtention est déjà décrit au brevet principal.

En effet, comme l'ont montré les études des spectres infrarouge et Raman, ledit produit HPA 23 n'est pas un 5-tungsto-2-antimoniate, mais cet hétéropolyanion répond à la formule structurale :



Le composé d'hétéropolyanion conforme à la présente invention est donc un antimonio-III-tungsto-VI-sodate. Il s'agit donc en même temps d'un composé complexe et d'un sel acide. Il peut se présenter en tant que tel ou sous forme de sels d'ammonium ou de métaux, en
35 particulier de métaux alcalins et alcalino-terreux. Sous un aspect préféré, le produit se présente sous la forme de son sel d'ammonium de formule :



Le produit peut exister sous la forme de nombreux hydrates. Toutes les formes hydratées de l'antimonio-III-tungsto-VI-sodate entrent dans le cadre de la présente invention. Sous l'aspect préféré de son sel d'ammonium, le composé se présente en particulier sous la forme d'un hydrate à 8 molécules d'eau.

Du point de vue de sa structure, le composé d'hétéropolyanions utilisé selon l'invention est un 9-antimonio-III-21-tungsto-VI-sodate comprenant au centre neuf atomes d'antimoine Sb et, répartis autour desdits atomes, 21 atomes de tungstène. La valeur caractéristique du rapport $r = W/Sb$ est donc voisine de 2,4.

L'invention couvre également toutes les formes isomères de l'hétéropolyanion en cause.

De plus, l'invention concerne non seulement le composé défini tel que décrit ci-dessus, mais aussi les mélanges qui sont obtenus par transformation de ce composé, sous l'influence des variations de pH. Le nouveau composé d'hétéropolyanion selon l'invention, à savoir le 9-antimonio-III-21-tungsto-VI-sodate, est stable à un pH de 6,5 à 7, c'est-à-dire au voisinage de la neutralité. Cette propriété est particulièrement avantageuse pour l'application dudit composé à titre de médicament. Ainsi qu'on l'a dit précédemment, le composé d'hétéropolyanions HPA 23 peut être utilisé en tant que tel ou sous forme acide, et de préférence sous la forme de ses sels métalliques pharmaceutiquement acceptables. Avantageusement, ces sels seront choisis parmi les sels de métaux alcalins ou alcalino-terreux, y compris l'ammonium. Les sels les plus courants sont les sels de sodium, de potassium ou d'ammonium et l'on préfère les sels d'ammonium.

Pour obtenir le 9-antimonio-III-21-tungsto-VI-sodate sous la forme de son sel d'ammonium, on fait réagir à chaud une solution aqueuse contenant l'ion Sb^{III} avec une solution 1 M de tungstate de sodium, le milieu réactionnel étant maintenu sensiblement à neutralité par addition d'hydroxyde d'ammonium concentré en quantité suffisante pour rendre le milieu incolore, auquel cas le sel d'ammonium désiré précipite et peut être recueilli par filtration, puis traité de la manière usuelle.

La température de la réaction est inférieure à la température d'ébullition du milieu réactionnel. Elle se situe par exemple au voisinage de 80°C. La solution aqueuse contenant l'ion Sb^{III} est avantagement préparée en dissolvant le composé $SbCl_3$ dans une

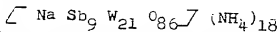
solution saturée de chlorure d'ammonium $\text{NH}_4 \text{Cl}$.

Le composé final est le 9-antimonio-III-21-tungsto-VI-sodate d'ammonium et son pH en solution aqueuse est voisin de 6,7. En solution aqueuse, le sel se présente sous la forme d'un tétramère.

Il est présent sous forme d'un hydrate de formule :



La figure 1 est un spectre infra-rouge du composé d'hétéropolyanion :



en solution dans le chlorure de potassium. Les longueurs d'ondes caractéristiques sont mentionnées sur le graphique.

La figure 2 est un spectre Raman dudit composé, à l'état solide.

A un pH de 7,5 dans une solution tamponnée 0,5 M tris et 0,5 M Na Cl, le polarogramme du produit présentait deux tensions respectivement à -1,11 et à -1,22 volts par rapport à l'électrode saturée au calomel.

En tant que de besoin, l'exemple ci-après illustre le mode d'obtention du composé HFA 23.

EXEMPLE :

Préparation du composé $\left[\text{Na Sb}_9 \text{W}_{21} \text{O}_{86} \right] (\text{NH}_4)_{18} \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$

A 125 millilitres d'une solution aqueuse 1 M de tungstate de sodium chauffée à 80°C, on a ajouté une solution aqueuse contenant 1 ion Sb^{III} et obtenue en dissolvant 11,4g de Sb Cl_3 dans 50 millilitres de $\text{NH}_4 \text{Cl}$. Juste avant que l'addition de la solution contenant 1 ion Sb^{III} soit terminée, on a ajouté une quantité suffisante d'hydroxyde d'ammonium concentré pour rendre le milieu de réaction incolore. On a filtré le sel d'ammonium précipité du composé d'hétéropolyanion, on l'a lavé avec une solution diluée de $\text{NH}_4 \text{Cl}$ et on l'a finalement cristallisé à partir d'eau distillée; le composé obtenu est le 9-antimonio-III-21-tungsto-VI-sodate d'ammonium pur. Il se présente sous forme tétramère en solution aqueuse. Cette dernière possède un pH voisin de 6,7. Le composé est stable en solution aqueuse au voisinage de pH 7. Dans son état naturel, le composé se présente sous forme d'une poudre blanche très soluble dans l'eau. Le produit cristallin est stable à la température ambiante et ne subit pas de modifications.

Pour les essais pharmacologiques, le composé est dissous dans une solution physiologique, c'est-à-dire une solution aqueuse de

Na Cl à 0,9%.

On constatera ainsi par l'exemple ci-dessus que le mode d'obtention du produit est exactement conforme à celui du brevet principal, la présente addition ayant donc simplement pour objet de rectifier et de préciser la structure du composé HPA 23 en cause.

La présente addition a également pour objet des compositions pharmaceutiques contenant, à titre d'agent actif, le composé HPA 23, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Selon une forme de présentation particulière, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont conditionnées sous forme injectable, par exemple en solution aqueuse (solution physiologique) à un pH voisin de la neutralité, en vue de l'injection à l'homme ou à l'animal.

Sous un autre aspect, l'invention a également pour objet des compositions contenant, en association, une quantité thérapeutiquement efficace de HPA 23 et d'interféron. A cet égard, il faut indiquer que les études antérieures (voir brevet principal) ont montré que l'HPA 23 n'agit pas comme inducteur d'interféron.

Selon la présente addition, on a maintenant trouvé qu'il existait une synergie entre l'HPA 23 et l'interféron. Cette synergie a été nettement mise en évidence sur des souris ayant reçu 50 mg/kg i.p. d'HPA 23 et 75.000 unités internationales d'interféron i.p. ou i.v. par souris, respectivement 1 h et 6 h avant inoculation sous-cutanée de 100 DL₅₀ de virus d'encéphalomyocardite (EMC). On a constaté en particulier un effet plus prononcé de l'HPA sur la préparation de la souche V R 129 du virus EMC qui présente un phénomène de zone. L'HPA 23 peut donc modifier la production d'interféron avec l'action induite par certains virus, tels que les virus EMC.

Les propriétés pharmacologiques du produit HPA 23 ont été décrites en détail dans le brevet principal. Il est donc inutile d'y revenir. Dans la description qui suit, on présentera cependant des résultats complémentaires relatifs à l'action de l'HPA 23 sur les infections provoquées chez les souris par le virus de l'encéphalomyocardite (EMC) et de la stomatite vésiculaire (VSV). Ces essais ont été effectués in vivo et confirment les propriétés remarquables de l'HPA 23 comme agent antiviral. Dans le brevet principal, on avait déjà mentionné que l'HPA 23 manifestait une large activité anti-virale in vitro, contre de nombreux virus RNA et DNA non oncogènes. Les essais pharmacologiques ci-après concernent deux sou-

ches de virus EMC et une souche de virus de stomatite vésiculaire (VSV).

ESSAIS IN VIVO

- 5 Souris - Des souris CD-1 des deux sexes, âgées de 4 à 6 semaines (achetées chez Charles RIVER, Elbeuf, France), ont été utilisées tout au long de l'étude.

- Virus : Les souches VR 129 et V 77 de virus EMC proviennent de l'American Type Culture Collection. Des solutions-mères des deux souches ATCC VR 129 et ATCC V 77 ont été préparées à partir d'extraits de cerveau de souris après un seul passage in vivo au laboratoire. Les inoculations de virus chez les souris ont eu lieu par voie sous-cutanée (s.c.) à raison de 0,2 ml par souris. La préparation de virus VR 129 d'EMC titrée par inoculations s.c. contenait $10^{7,5}$ DL₅₀/0,2 ml alors que la solution de souche V 77 d'EMC renfermait $10^{7,0}$ DL₅₀/0,2 ml. Une DL₅₀ chez les souris (inoculation s.c.) correspondait respectivement pour les souches VR 129 et V 77 à 3 et 10 TCID₅₀ dans des cultures monosouches de cellules L.

- Une solution-mère d'une souche Indiana de virus de stomatite vésiculaire (VSV) a été préparée dans des cellules L de souris et titrait 10^8 LD₅₀/ml chez la souris après inoculation intranasale. L'inoculation intranasale a été réalisée sur des souris légèrement anesthésiées à l'éther, 0,1 ml de suspension virale étant lentement introduit goutte à goutte dans la partie externe du nez. Seules ont été incluses dans l'expérience les souris ayant absorbé l'inoculum par inhalation.

- HPA 23 - L'HPA 23 a été préparé selon le procédé décrit dans l'exemple ci-dessus. Il a été dissous dans de l'eau distillée immédiatement avant emploi et habituellement inoculé par voie intrapéritonéale (i.p.) et, dans certains essais, par voie sous-cutanée.
- 30 Toxicité de l'HPA 23 vis-à-vis de la souris.

- La toxicité aiguë a été déterminée par une simple injection i.p. de quantités progressives d'HPA 23 à des souris CD-1 (10 par dose) qui ont été mises en observation pendant les cinq jours suivants. La toxicité sub-aiguë a été déterminée par injection de quantités progressives du composé à des souris CD-1, une fois par jour pendant cinq jours consécutifs; les animaux ont été mis en observation pendant les cinq jours suivant la dernière injection. On a pu ainsi calculer des valeurs DL₅₀ aiguës et sub-aiguës pour l'HPA 23.

Tout en effectuant l'essai de toxicité aigue, il était également possible de déterminer la dose d'HPA 23 la plus faible qui, sans tuer l'un quelconque des animaux, provoquait néanmoins une perte de poids sensible.

5 Interféron

L'interféron murin a été préparé dans des cultures monocouches de cellules L de souris auxquelles avait été ajouté du virus de maladie Newcastle inactivé par les ultra-violets [YOUNGNER, J.S, SCOTT, A., HALLUM, I.V. & STINEBRING, W.R. (1966). Interferon production by inactivated Newcastle disease virus in cell cultures and in mice. Journal of Bacteriology 92,862]. Les préparations ont été dialysées pendant une nuit à pH 2 et ensuite pendant 48 heures avec trois changements de milieu de culture de cellule. Récupération du virus dans le sang et le cerveau de souris traitées et de souris témoins, infectées par la souche VR 129 d'EMC.

Pour savoir si la protection de souris infectées par la souche VR 129 d'EMC correspond à une inhibition de la multiplication virale par l'HPA 23, on a inoculé à deux groupes de trente souris, par voie sous-cutanée, 20 DL₅₀ de virus. Un groupe a été traité par de l'HPA 23 (100 mg/kg i.p. une heure avant l'inoculation du virus EMC) alors que l'autre groupe auquel a été injectée de l'eau distillée a servi de témoin. Dans chaque groupe, on a déterminé sur quinze souris la mortalité pendant les 10 jours suivant l'injection et des titrages de virus ont été réalisés dans le sang et les cerveaux des autres souris prélevés 1,2 et 3 jours après l'inoculation du virus par emploi, pour chaque point, d'échantillons mis en commun provenant de cinq souris. Les titrages ont été effectués par inoculation sous-cutanée à des souris CD-1 adultes de dilutions décuplées de chaque masse commune en utilisant dix souris pour chaque dilution et également, en parallèle, dans des cultures en tube de cellules L traitées dans les mêmes conditions de dilution. La mortalité chez les souris et l'effet cytopathique significatif dans les cultures de cellules ont servi de point final pour la réaction.

Analyses statistiques -

35 Le test de χ^2 a été utilisé pour l'analyse statistique du pourcentage de survivants. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour la comparaison des durées de survie.

Résultats

Toxicité de l'HPA 23

40 La toxicité aigue chez des souris adultes a été observée avec

des doses de 750 mg/kg d'HPA 23. La dose la plus faible provoquant une perte de poids sensible chez des souris normales s'est trouvée être de 250 mg/kg i.p.

Effets de l'HPA 23 sur les infections par EMC et VSV

5 Le tableau I résume les résultats d'une série d'essais avec la souche VR 129 d'EMC : une protection importante des animaux a été obtenue par inoculation i.p. ou s.c. d'HPA 23 pratiquée 1 heure avant l'inoculation d'environ 20 DL₅₀ de virus par souris.

Compte-tenu des résultats d'un certain nombre d'expériences individuelles dont les données sont consignées dans le Tableau I, la dose de 100 mg/kg i.p. a été choisie comme étant la plus efficace, bien que la dose de 50 mg/kg i.p. ait encore présenté un haut degré d'efficacité une fois administrée avant inoculation du virus. Les traitements sous-cutanés par de l'HPA 23 se sont également révélés actifs, mais ce mode de traitement n'a pas fait l'objet d'investigations plus poussées puisqu'il présentait l'inconvénient d'être identique à celui utilisé pour l'inoculation du virus. La comparaison avec des chiffres de toxicité d'HPA 23 chez des souris non infectées montre que la dose de composé la plus régulièrement efficace contre la mortalité provoquée par le virus EMC, à savoir 100 mg/kg i.p., est 7,5 fois au-dessous de la DL₅₀ aigue de l'HPA 23 administré par la même voie (750 mg/kg i.p.) et 3,5 fois au-dessous de sa toxicité sub-aigue (350 mg/kg i.p.). Avec une seule injection i.p. de 100 mg/kg, on a encore enregistré une protection importante contre l'EMC lorsque les souris recevaient le composé 4 heures après l'inoculation du virus, mais on n'a observé aucun effet lorsque le traitement débutait 24 heures après l'inoculation du virus.

Le Tableau II indique les résultats d'une comparaison entre les souches V 77 et VR 129 du virus EMC en ce qui concerne leur sensibilité à l'effet protecteur de l'HPA 23 chez des souris infectées par celles-ci. Dans cette expérience, la mortalité chez les animaux témoins auxquels a été inoculée la souche VR 129 était plus faible que d'après les données expérimentales rassemblées dans le tableau I; néanmoins, l'efficacité de l'HPA 23 était comparable avec un rapport dose-effet bien net. D'autre part, chez des souris auxquelles a été inoculée la souche V 77, le pourcentage de souris ayant survécu jusqu'au jour + 4 après l'inoculation du virus s'était sensiblement accru par le traitement à l'HPA 23, mais même à la dose

de 100 mg/kg i.p. aucune souris n'a survécu jusqu'au jour + 10. Bien que le traitement par l'HPA 23 ait entièrement protégé une proportion très importante de souris contre la mortalité provoquée par la souche VR 129 (puisque aucun animal n'est mort par suite d'infection au-delà du 10ème jour suivant l'infection), il n'a prolongé que de quelques jours la durée de survie moyenne des souris infectées par la souche V 77.

Le tableau III présente les résultats d'une étude de l'efficacité du traitement par l'HPA 23 chez des souris auxquelles ont été inoculées des quantités croissantes de la souche VR 129 du virus EMC. On a également obtenu une protection totale d'un nombre important de souris après administration aux animaux de 200 DL₅₀ du virus, c'est-à-dire 10 fois plus que la quantité habituelle, tandis qu'avec un inoculum de 2000 DL₅₀, on n'a enregistré qu'une durée de survie accrue comme dans le cas de l'infection par 20 DL₅₀ de la souche V 77. Dans ces essais, comme dans ceux résumés dans le tableau II, l'HPA 23 a été administré sous forme d'un traitement unique 1 heure avant l'inoculation du virus. Une activité protectrice de l'HPA 23 contre l'infection intranasale par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) a également été mise en évidence (tableau IV); 30 à 50% des souris traitées par l'HPA 23 étaient totalement protégées. Le reste des animaux avait une durée de survie moyenne prolongée comparable à celle des souris témoins.

Absence d'effet de l'HPA 23 sur les teneurs en virus EMC dans le sang et le cerveau.

Pour savoir si la protection des souris traitées par l'HPA 23 contre l'infection létale par la souche VR 129 du virus EMC était due à une inhibition in vivo de la multiplication du virus, les teneurs en virus ont été déterminées dans le sang et le cerveau de souris témoins et de souris traitées 1, 2 et 3 jours après l'inoculation du virus. Ainsi qu'il est usuel, le traitement consistait en une seule injection de 100 mg/kg i.p. d'HPA 23 une heure avant l'infection. Les titrages ont été effectués en parallèle sur des souris et sur des cultures de cellules L (sensibilité des deux essais égale à $\pm 0,5 \log_{10}$): les deux méthodes ont fourni des résultats sensiblement identiques, faisant apparaître une virémie modérée atteignant son pic au jour + 2 et un fort accroissement de 4 log₁₀ du titre en virus dans le cerveau entre le jour + 2 et le jour + 3. On n'a trouvé aucune différence statistiquement significative entre des souris traitées et des souris témoins en ce qui concerne

les teneurs en virus dans le sang et le cerveau au cours de l'un quelconque des trois intervalles choisis dans cette expérience : la survie au-delà de 10 jours de souris non sacrifiées en vue de l'obtention d'échantillons de sang et de cerveau était de 0/15 dans le groupe témoin et de 11/15 dans le groupe traité par l'HPA 23. C'est ainsi qu'une forte proportion de souris du dernier groupe ont survécu bien que la teneur en virus de leur cerveau ait atteint des valeurs (environ 10^7 unités infectieuses par ml) égales à celles des souris témoins dont 100% sont mortes.

10 Synergie entre HPA 23 et interféron

Au cours des titrages de la souche VR 129 du virus EMC dans les cultures de cellules L, on a observé un phénomène de zone singulier qui était absent dans le cas de la souche V 77 : les effets cytopathiques n'étaient pas visibles jusqu'à une dilution de 1000 fois de la solution de virus. On a alors recherché la possibilité de synergie entre le procédé et l'interféron de souris exogène. Les résultats de cet essai figurent dans le tableau 5 : la synergie a été nettement mise en évidence chez des souris ayant reçu 50 mg/kg i.p. d'HPA 23 à 75.000 unités internationales d'interféron i.p. ou i.v. par souris, respectivement 1 heure et 6 heures avant inoculation s.c. de 100 DL₅₀ de virus.

Les résultats des essais ci-dessus confirment et étendent les observations antérieures concernant l'activité protectrice in vivo de l'HPA face aux infections virales létales des souris : le traitement des animaux peu avant ou après inoculation de l'un ou l'autre des virus d'encéphalomyocardite (EMC) ou de stomatite vésiculaire (VSV) à l'aide de doses d'HPA 23 bien au-dessous des doses toxiques de cet ion minéral condensé et par une voie différente de celle utilisée habituellement pour l'inoculation du virus, a conduit à une prolongation considérable de la durée de survie et à une protection totale d'une grande partie des souris.

L'une des conclusions les plus intéressantes de ces essais concerne la synergie entre l'interféron et le composé HPA 23. Comme le montre le tableau 5, cette synergie a été observée dans le cas de l'infection EMC.

TABLEAU 1

Effet de l'HPA 23 sur l'infection de souris adultes par la souche VR 125 du virus EMC (virus inoculé par voie sous-cutanée)

5

10

15

20

Programmation du traitement HPA 23	Dose d'HPA 23 (mg/kg)	Voie	Survivants/Souris infectées totales	Evaluation statistique
Témoins			8/150 (5,3%)	
1 heure avant inoculation du virus	25	1.p.	5/20 (25,0%)	P < 0,001
	50	1.p.	24/35 (68,5%)	P < 0,001
	100	1.p.	54/85 (63,5%)	NS
	100	s.c.	13/30 (43,3%)	P < 0,001
4 heures après inoculation du virus	50	1.p.	4/15 (26,6%)	NS
24 heures après inoculation du virus	100	1.p.	18/30 (60,0%)	P < 0,001
	50	1.p.	0/15 (0,0%)	NS
	100	1.p.	3/30 (10,0%)	NS

NS : statistiquement non significatif.

TABLEAU 2 :

Effet de l'HPA 23 sur l'infection de souris adultes par les souches VR 129 et V 77 du virus EMC

25

30

35

Souches de virus, 20 DL inoculation s.c.	Dose d'HPA 23 (mg/kg i.p.) 50 (1 heure avant inoculation du virus)	Durée de survie moyenne (jours)	Survivants/animaux inoculés jour + 4 - jour + 10	Evaluation statistique
VR 129	0	5,4	10/15	4/15
	25	6,0	12/15	5/15
	50	N D	14/15	8/15
	100	N D	15/15	12/15
V 77	0	3,2	5/15	2/15
	25	3,3	6/15	0/15
	50	4,4	11/15	0/15
	100	5,4	13/15	0/15

± au jour + 4

ND = non déterminée en raison du grand nombre de survivants au jour + 10

TABLEAU 3 :

- 5 Effet de l'HPA 23 sur l'infection de souris adultes par la souche VR 129 du virus EMC (volumes d'inoculum croissants)

10	Dose de virus (DL ₅₀ / souris) inocula- tion s.e.	Dose de TA mg/kg i.p. (1 heure avant inoculation)	Survivants/animaux inoculés		Evaluation statistique
			jour + 4-jour + 10		
	20	0	12/15	5/15	
15		100	15/15	14/15	P < 0,01
		150	15/15	15/15	P < 0,01
	200	0	5/15	0/15	
		100	14/15	7/15	P < 0,01
		150	13/15	5/15	P < 0,01
20	2000	0	3/15	0/15	
		100	11/15	1/15	P < 0,01 (*)
		150	10/15	1/15	P < 0,01 (*)

(*) au jour + 4.

25 TABLEAU 4 :

- Effet de l'HPA 23 sur l'infection intranasale de souris adultes par 80 DL₅₀ de virus de stomatite vésiculaire (VSV) (souche Indiana).

30	Traitement (1 heure avant inoculation du virus)	Durée moyenne de survie des souris mortes	Souris en vie 10 jours après l'inoculation	Evaluation statistique
	Sans traitement	5,9 ± 2,0 jours	1/25	
35	HPA 23	7,3 ± 2,4 jours	8/25	P < 0,01
	50 mg/kg i.p.			
	HPA 23	8,2 ± 2,3 jours	12/25	P < 0,001
	100 mg/kg/i.p.			

On a rassemblé sous forme des tableaux 6 et 7 les résultats d'autres essais sur souris infectées par les virus EMC.

TABLEAU 5

SYNERGIE ENTRE HPA 23 ET INTERFERON MURIN CHEZ LA SOURIS INFECTEE PAR DES VIRUS EMC SOUCHE ATCC VR 125

Traitement a)	HPA 23 néant	i.p. intrapéritonéale i.v. intraveineuse	
		HPA 23 50 mg/kg i.p.	HPA 23 100 mg/kg i.p.
Interféron néant	0/15 3,1 ± 0,7 jours	1/10 4,5 ± 1,9 jours	4/10 6,8 ± 2,6 jours
Interféron non dilué 75.000 I.U./souris i.p.	5/10 7,1 ± 3,1 jours	9/10 9,4 ± 1,8 jours	NT ^{b)}
Interféron 1:3 25.000 I.U./souris i.p.	3/10 5,5 ± 3,0 jours	NT ^{b)}	7/10 8,2 ± 2,7 jours
Interféron 1:9 8.000 I.U./souris i.p.	1/10 4,4 ± 2,1 jours	NT ^{b)}	NT ^{b)}
Interféron non dilué 75.000 I.U./souris i.v.	6/10 7,7 ± 2,9 jours	10/10 ≥ 10,0 jours	NT ^{b)}

a) Traitement à l'interféron : 6 heures avant l'inoculation du virus.

Traitement à l'HPA 23 : 30 minutes avant l'inoculation virale

b) NT = expérience non effectuée.

TABLEAU 6
SOURIS VIVANTES APRES INFECTION EMC

JOURS (survie)	TEMOINS VIRUS					HPA 23 2 mg/souris i.p. (administré 30 minutes avant infection)				
	3 DL ₅₀	30 DL ₅₀	300 DL ₅₀	3000 DL ₅₀	30 DL ₅₀	30 DL ₅₀	300 DL ₅₀	3000 DL ₅₀	30 DL ₅₀	3000 DL ₅₀
0	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
1	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
2	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
3	15	15	15	14	15	15	15	15	15	15
4	15	12	5	3	15	15	14	11	15	15
5	14	8	1	0	15	15	9	1	15	15
6	14	6	0		14	14	7	1	15	15
7	13	3			14	14	7	1	15	15
8	13	5			14	14	7	1	15	15
9	13	5			14	14	7	1	15	15
10	13	5			14	14	7	1	15	15
Survie au jour + 10	13/15	5/15	0/15	0/15	14/15	14/15	7/15	1/15	1/15	1/15

i.p. = par voie intra-péritonéale.

TABLEAU 7
SOURIS SURVIVANTES APRES INJECTIONS EMC

Jours après l'in- fection	TV A	IF pur (i.p.) B	IF 1/3 (i.p.) C	IF 1/9 (i.p.) D	IF pur (i.v.) E	HPA 23 1 mg (i.p.) F	HPA 23 2 mg (i.p.) G	IF pur + HPA 23 1 mg H	IF 1/3 + HPA 23 2 mg K	IF pur + IV+HPA 23 1 mg L
0	15	10	10	10	10	10	10	10	10	10
1	15	10	10	10	10	10	10	10	10	10
2	15	10	10	10	10	10	10	10	10	10
3	14	10	10	10	10	10	10	10	10	10
4	3	8	7	5	9	7	10	10	10	10
5	0	6	3	3	8	3	8	9	7	10
6		6	3	2	6	1	4	9	7	10
7		6	3	1	6	1	4	9	7	10
8		5	3	1	6	1	4	9	7	10
9		5	3	1	6	1	4	9	7	10
10		5	3	1	6	1	4	9	7	10
survivan- tes défi- nitives	0/15	5/10	3/10	1/10	6/10	1/10	4/10	9/10	7/10	10/10

TV = témoins virus i.p. = par voie intra-péritonéale
IF = interféron i.v. = par voie intra-véneuse

2334366

Dans les tableaux 5 à 7 ci-dessus les notations ci-après ont été utilisées :

A Témoins virus

B Interféron murin 75.000 unités/souris

i.p. administré 6 heures avant l'infection

C Interféron murin 25.000 unités/souris

i.p. administré 6 heures avant l'infection

D Interféron murin 8.000 unités/souris

i.p. administré 6 heures avant l'infection

E Interféron murin 75.000 unités/souris

i.v. administré 6 heures avant l'infection

F HPA-23 1 mg/souris

i.p. administré 30 minutes avant l'infection

G HPA-23 2 mg/souris

i.p. administré 30 minutes avant l'infection

H Interféron murin 75.000 unités/souris

i.p. administré 6 heures avant l'infection

+ HPA-23 1 mg/souris, - 30 mn.

K Interféron murin 25.000 unités/souris

i.p. administré 6 heures avant l'infection

+ HPA-23 2 mg/souris, - 30 minutes.

L Interféron murin 75.000 unités/souris

i.v. administré 6 heures avant l'infection

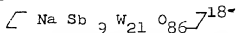
+ HPA-23 1 mg/souris, - 30 minutes.

i.p. - par voie intra-péritonéale

i.v. - par voie intra-veineuse.

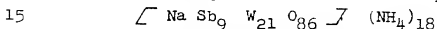
REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique pour le traitement préventif et curatif des infections virales chez l'homme et l'animal et des processus pathologiques dues aux virus, caractérisée en ce qu'elle contient, à titre d'agent actif, une quantité efficace d'un composé d'hétéropolyanion; le 9-antimonio-III-21-tungsto-VI-sodate de formule



2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé d'hétéropolyanion est présent sous forme de sels d'ammonium ou de métaux, en particulier de métaux alcalins et alcalino-terreux, pouvant se trouver sous forme d'hydrates.

3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle contient le composé



4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que le composé est présent sous la forme d'un hydrate de formule:



5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle contient en outre une quantité synergiquement efficace d'interféron.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est notamment présentée en vue de l'injection, en particulier sous forme de solution saline physiologique (solution aqueuse à 0,9% de Na Cl environ).

FIG 1

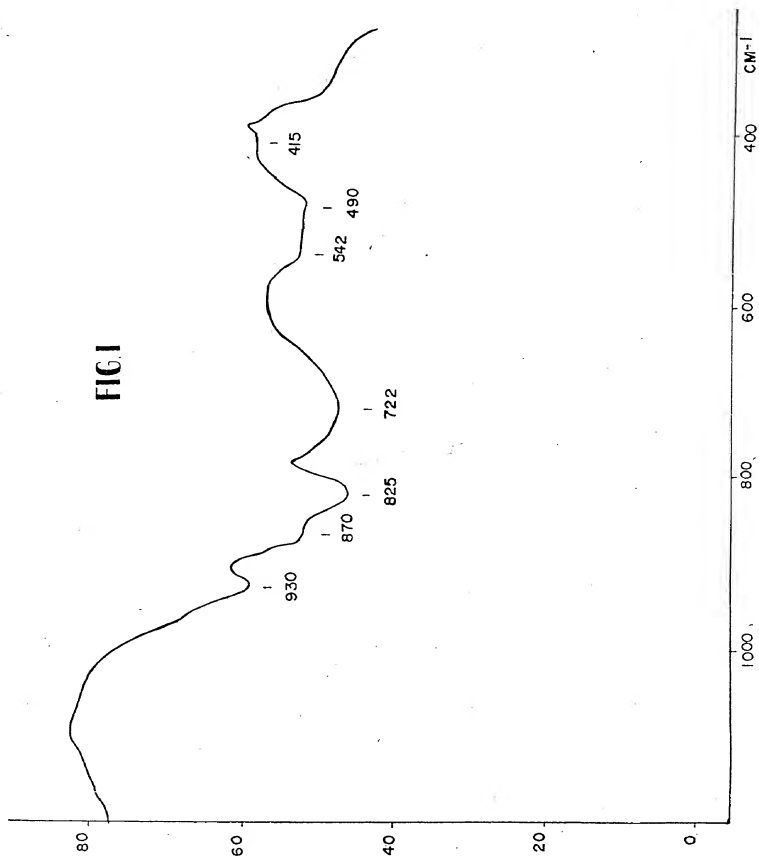


FIG 2

